

536, 963

(2)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



31 MAY 2005



(43) 国際公開日
2004 年 6 月 17 日 (17.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/050114 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, A61P 1/00, 3/12, 9/00, 15/10, 21/04, 25/00, 25/02, 25/14, 25/16, 25/18, 25/22, 25/24, 25/28, 27/06, 39/02, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015227
- (22) 国際出願日: 2003 年 11 月 28 日 (28.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-348714
2002 年 11 月 29 日 (29.11.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県 熊本市 大窪一丁目 6 番 1 号 Kumamoto (JP).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 川村 亮一 (KAWAMURA, Ryoichi) [JP/JP]; 〒860-0881 熊本県 熊本市 麻生田 4 丁目 7-30 A201 Kumamoto (JP). 成瀬 毅志 (NARUSE, Takeshi) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県 菊池郡 西合志町須屋 2684-12 Kumamoto (JP). 平嶋 正樹 (HIRASHIMA, Masaki) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県 菊池郡 西合志町須屋 2629-5 Kumamoto (JP). 上仲 一義 (KAMINAKA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒861-1102 熊本県 菊池郡 西合志町須屋 3649 ガーデンコートみずき台 G202 Kumamoto (JP). 松田 純一 (MATSUDA, Junichi) [JP/JP]; 〒862-8002 熊本県 熊本市 龍田町弓削 1-31-2 Kumamoto (JP). 前田 浩明 (MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒860-0076 熊本県 熊本市 壺川 1 丁目 2-11 Kumamoto (JP). 野田 百美 (NODA, Mami) [JP/JP]; 〒819-0044 福岡県 福岡市 西区生松台 1-21-2 Fukuoka (JP). 和田 圭司 (WADA, Keiji) [JP/JP]; 〒187-0031 東京都 小平市 小川東町 4-1-1 1-301 Tokyo (JP).

[続葉有]

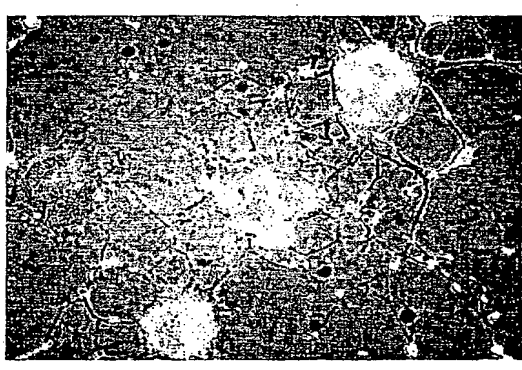
(54) Title: NOVEL AGENT FOR IMPROVING NEUROTRANSMISSION FAILURE

(54) 発明の名称: 新規な神経伝達機能異常疾患改善剤

A
SeP非存在下



B
SeP(4.36µg/mL)存在下



A...IN THE ABSENCE OF SeP
B...IN THE PRESENCE OF SeP (4.36µg/mL)

(57) Abstract: It is intended to provide a novel agent for improving neurotransmission failure. In a preferable case, an agent for improving neurotransmission failure which contains, as the major active ingredient(s), a selenocysteine-containing protein typified by selenoprotein P, a C-terminal peptide of this protein or such peptides. This agent is appropriate in improving neurotransmission failure diseases caused by various factors.

(57) 要約: 新規な神経伝達機能異常疾患改善剤を提供する。好適にはセレノプロテインPで例示されるセレノシステイン含有タンパク質または当該タンパク質のC末端ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要有効成分とする神経伝達機能異常疾患改善剤。種々の病因に起因する神経伝達機能異常疾患に対する好適な改善剤が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/050114 A1



(74) 代理人: 河宮 治 , 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒
540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号
IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

新規な神経伝達機能異常疾患改善剤

技術分野

本願発明は医療用医薬品の分野に属する血漿タンパク質の新たな用途に関する。
5 さらに詳細には、神経伝達に関わる中枢及び末梢神経系に起因する神経並びに筋
変性疾患に対する医薬品に関する。より詳しくは、血漿タンパク質の一種である
セレノプロテインPに例示されるセレノシステイン含有タンパク質を、好適には
当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主たる有
10 効成分として含有する神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけシナプス伝達やア
セチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経細胞活性化に改善作用を有
する薬剤に関する。

背景技術

神経回路網において神経細胞と神経細胞間あるいは神経細胞と効果器細胞（例
えば筋細胞）間の接合部をシナプスという。シナプスは神経回路網の情報伝達に
15 にとって重要な部位であり、通常、神経細胞の軸索末端部を情報の出力部（シナプ
ス前部）とし、樹状突起、細胞体を情報の入力部（シナプス後部あるいは後膜）
としている。神経末端に信号が伝わると、シナプス前部のシナプス小胞が開口分
泌を起こし、内部に貯蔵されていた神経伝達物質がシナプス間隙に放出され、シ
ナプス後膜に存在する神経伝達物質のレセプターに結合し、次の細胞に情報が伝
20 えられる（例えば、「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社参照）。

神経伝達物質として、アセチルコリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、γア
ミノ酪酸（GABA）、グリシン、セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリン、アデ
ノシン三リン酸（ATP）、各種の神経ペプチドなどが挙げられる。例えば、アセ
チルコリンは、生体内でコリンアセチルトランスフェラーゼによってコリンとア
セチルCoAから合成され、シナプス小胞に貯蔵される。このようなアセチルコリ
25 ンを放出する神経細胞をコリン動作性ニューロンと呼ぶ。中枢神経系では、前脳
の基底部から大脳皮質や海馬への投射、脳幹部の橋脚部並びに外背側被蓋部から
大脳皮質への投射の他、線条体内の介在ニューロンや前庭核から小脳への投射、
または脊髄から下降性運動ニューロンもコリン動作性神経である。末梢神経系で

は、交感神経の1次神経、副交感神経の1次神経と2次神経、運動神経はいずれもその神経終末でアセチルコリンを分泌する（例えば、「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社参照）。

5 一方、情報を受け取るシナプス後膜にあるアセチルコリンレセプターには大きくムスカリン性とニコチン性の2つのタイプが存在する。ムスカリン性は7回膜貫通型受容体ファミリーに属し、Gタンパク質を介してシグナルを細胞内に伝達する。ムスカリン性受容体はさらにホモロジーから5種類のサブタイプに分類され、Gタンパク質の種類によってフォスホオリパーゼCを活性化するタイプ（M1, M3, M5）とアデニル酸シクラーゼを抑制するタイプ（M2, M4）の2種類に
10 分類される。前者は細胞に対して興奮的に、後者は抑制的に作用する。これらのレセプターは脳全般以外に心臓や平滑筋や外分泌腺組織に広く分布する。ニコチン性受容体は、5つのサブユニットから構成されるイオンチャンネルで、2つの α サブユニットと1つずつの β 、 ϵ 、 δ の5つから構成される。少なくとも α サブユニットには9種類、 β サブユニットには4種類のサブタイプが知られている。
15 ニコチン性受容体はその分布様式から、骨格筋型と神経型に分類されている（例えば、「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社参照）。

アセチルコリン以外の神経伝達物質もそれぞれに対応したレセプターがあり、アセチルコリンレセプター同様、各々特有の神経組織分布を示している。これらの神経伝達物質がシナプス間隙で適正に授受されることによりレセプターを活性化し、さらにセカンドメッセンジャーを活性化し、神経細胞の生理学的反応を引き起こしている。レセプターによって、反応は興奮的（新たな活動電位の開始）に伝達されるか、抑制的（活動電位発生の抑制）になるか制御されており、これらが複雑に絡み合って、生体内の神経回路網は動いている（例えば、「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社参照）。一方、一酸化窒素（NO）の
20 ようにレセプターははっきりしないが、例えば自律神経系の神経終末から放出され、効果器官の平滑筋の弛緩や脳の血流調節、陰茎海綿体の勃起などの作用を持つため神経伝達物質の一種であると考えられているものもある（例えば、「標準生理学第5版」本郷ら監修、医学書院参照）。NOの細胞間シグナル伝達物質としての作用は、受容体やトランスポーターを介さずに細胞膜を直接越えて拡散す
25

るため、作用範囲が広範に渡る。NOは、サイクリックGMP（cGMP）の合成酵素である可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を誘導し、合成されたcGMPはcGMP依存性リン酸化酵素を活性化し、細胞内の生理作用を作動させ、細胞を活性化する（例えば、「NOの生理作用と疾患」谷口ら編集、羊土社参照）。

5 その一方で、NOはシナプス後部から放出され、シナプス前部終末からの神経伝達物質放出を調節する逆方向情報伝達物質としても作用するためシナプス可塑性の調節因子と考えられている（例えば、「NOの生理作用と疾患」谷口ら編集、羊土社参照）。

10 このような神経伝達物質の関わる神経伝達に異常が生じると、様々な疾患を引き起こすことになる。例えば、アセチルコリンによる情報伝達システムは記憶学習の機能、自律神経、運動神経、交感及び副交感神経機能に関わっており（例えば、「脳神経科学イラストレイテッド」森ら編集、羊土社参照）、アセチルコリンによる情報伝達に異常が生じると、これらの機能に障害が生じ、様々な疾病の原因となる。神経伝達の欠陥に伴う疾患として、様々な病気が知られている。例
15 えば、神経伝達物質の不均衡による疾患として、アルツハイマー病、不安、自閉症、脳障害、うつ病、ハンチントン病、躁病、疼痛、パーキンソン病など。神経伝達物質のレセプターに欠陥がある疾患として、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症など。神経伝達物質の神経細胞取り込み低下による疾患として、筋萎縮性側索硬化症など。イオンチャネルに欠陥があり神経伝達が正常
20 にできない疾患として、発作性運動失調、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート・イートン症候群、先天性パラミオトニア、ラスムッセン脳炎、脊髄小脳変性症など。中毒疾患として、ボツリヌス中毒、蛇毒による中毒など、が知られている（例えば、「Web版メルクマニュアル第17版日本語版」<http://www.merckmanual.banyu.co.jp/>及び「脳・神経研究の進
25 めかた」真鍋ら編集、羊土社参照）。

この他、自律神経系での神経伝達障害を改善し、病態を改善する薬剤が開発されている。例えば、眼圧低下を目的とした緑内障の治療薬として、アセチルコリンアナログであるピロカルピンやカルバコールが知られている（例えば、「医学大辞典」CD-ROM版、南山堂参照）。唾液腺のムスカリン受容体を刺激し、

唾液分泌を促進する薬剤や、アセチルコリン遊離促進作用を持った消化管運動賦活剤が機能的胃腸症の治療薬として開発されている（例えば、New Current, 26, 13, 2002参照）。

発明の開示

5 (発明が解決しようとする技術的課題)

これらの疾患に対する薬剤は、神経伝達物質、そのアゴニスト、アンタゴニストあるいは抗コリンエステラーゼのように神経伝達物質の酵素分解や再吸収を阻害し、その半減期を延長させるものが大部分で、いずれも神経伝達物質とレセプターの直接的な反応をターゲットにしているものが多い（例えば、New Current, 10 2, 7, 1996参照）。しかし、神経伝達物質とそのレセプターは前述のように種類が多く、その作用も興奮性、抑制性など多彩である。そのため思わぬ副作用が起こることがある。例えば、抗コリンエステラーゼ剤の過剰投与によるコリン動作性クリーゼ（急激な筋肉の麻痺症状）が生じたり、長期間投与でレセプターの変性が促進され、病態を悪化させたりすることがある（例えば、「重症筋無力症」
15 <http://www.nanbyou/tokuteisikkan/s/si7.html>参照）。また、神経伝達は自律神経系に深く関わっているので危険な心肺機能低下が起こる可能性も否定できない。これらの副作用を解決するために、これまでの薬剤とは異なる作用メカニズムを持ち、副作用の少ない安全な薬剤が求められている。

(その解決方法)

20 上述の状況の下、本願発明者等は先に、血液成分由来のタンパク質で、セレノシステイン含有タンパク質の一種であるセレノプロテインP（以下、SePと称することがある）に、そしてより好適な態様として当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドに、従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められることを見出し、この知見を基に特許出願した（例えば、特願PCT/JP99/063
25 22参照）。さらに、本願発明者は、新たな神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけ、シナプス伝達やアセチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経伝達に改善作用を有する薬剤を供するべく鋭意研究した結果、驚くべきことに従来試みられることのなかった前記セレノプロテインPまたはそのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、細胞死抑制活性のみならず、神経細胞を用いた培養

実験や、モデル動物での実際の生体内投与によって、神経伝達機能を改善する作用を持つことを見出し、この知見に基づいて本願発明を完成するに至った。

セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ (gulutathion-peroxidase) とは異なるセレン含有タンパク質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン (Selenocystein) の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にラットセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該タンパク質は最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された (例えば、Hill K. E. およびBurk R. F., Biomed Environ Sci., 10, p.198-208, 1997参照)。

1993年にはヒトセレノプロテインPの核酸塩基配列及びアミノ酸配列が報告された (例えば、K. E. Hillら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 537, 1993参照)。セレノプロテインPの機能はほとんど不明であったが、最近、in vitroの系でphospholipid hydroperoxideの還元活性 (例えば、Y. Saitoら, J. Biol. Chem. 274, 2866, 1999参照) やperoxynitriteの消去活性 (例えば、G. E. Arteel ら, Biol. Chem., 379, 1201, 1998参照) があるとの報告がなされた。また、Se欠乏時に脳に特異的にSeを運搬するとの報告 (R. F. Burk ら., Am. J. Physiol., 261, E26-E30, 1991参照) や、神経細胞のsurvival promoting factorとしての作用 (J. Yan および J. N. Barrett, J. Neurosci., 18, 8682, 1998参照) が見出され、神経細胞の生存と関連が示唆されていた。しかし、この2つの報告からセレノプロテインPの神経細胞生存維持活性以外の神経細胞に対する具体的な作用を類推することは難しく、ましてや、本願発明で述べるようなセレノプロテインPの神経細胞活性化や神経伝達機能に関わるような作用を見出した例もない。

本願発明者らは、具体的な事例として、神経様細胞であるNG108-15細胞を神経細胞に分化させる際にセレノプロテインPを培地に添加すると、神経突起進展の複雑さや結節状構造 (varicosity) が増強され、シナプス形成を促進することを見出した。また、ムスカリンアゴニストであるピロカルピンを用いたてんかん誘導のモデルマウスで、セレノプロテインPがてんかん症状を増強し、アセチルコ

リンレセプターの作用を増強することを見出した。さらに、マウス初代神経細胞を用いた培養で細胞に影響の出ない濃度の一酸化窒素を発生させた際にセレノプロテインPを添加しておく、と、神経細胞のミトコンドリア機能が亢進し、細胞が活性化されることを見出した。これらのことから、シナプス形成やアセチルコリンレセプター機能やNOによる神経細胞活性化の亢進、すなわち神経細胞の関わる神経伝達機能を改善する作用をセレノプロテインPが有していることが示された。

本願発明は、セレノプロテインPの前記知見に基づく新たな薬効に関するものであり、本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の本態はセレノプロテインPである。さらに詳細には、セレノプロテインPの中のセレンを含むセレノシステインに特徴があり、このアミノ酸が神経伝達とりわけシナプス伝達やアセチルコリンレセプター動作、一酸化窒素による神経伝達の改善作用の中心的アミノ酸である。本願発明者等は、先の特許出願において、血液成分由来のタンパク質であるセレノプロテインPのC末端側ペプチド断片に従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められること、その活性にはセレノシステインが関与していることを開示した。本願発明で述べる活性にも、含有されるセレノシステインが関与していることが明らかである。従って、セレノシステインを含み細胞死抑制活性を持つタンパク質及び／またはペプチド群は、神経伝達機能異常疾患改善剤の候補となりうる。

そもそも、本願発明に係るセレンは、微量必須元素の一つであり、それが欠乏した場合には心筋症などを伴う重篤な欠乏症が知られている。また、無血清培養の培地に亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であることから、セレンが細胞レベルでの生存維持・増殖に必須であることが示されている。しかし、セレン化合物が毒物指定されていることから理解されるように、有効量と危険量の幅、つまり安全域の濃度幅が狭く、適量以上のセレン化合物は一般的には細胞にとって毒性を示し、逆に細胞死を誘導する。例えば、セレンの急性中毒症状として、顔面蒼白、神経症状、神経障害、皮膚炎、胃腸障害などが知られている。また、細胞培養にセレノシステインの2量体であるセレノシスチンを添加すると、単独ではかなり強い毒性を示す。これに対して、本願発明の好適な態様であるセレノプ

ロテインP、セレノプロテインPのC末端側断片は、その構造中に9～10個のセレノシステインを含むにも拘わらず、強い毒性は観察されなかった。もともとセレノプロテインPは血液中に存在し、生体内を循環していると考えられることから、医薬品としての安全性は高いと考えられる。このことから、本発明の薬効作用を示すセレノプロテインPの特徴として、セレノシステインを含み、なおかつ毒性が減弱していることが重要と思われる。

(従来技術より有効な効果)

本願発明のペプチドまたは当該ペプチド群は、毒性の低減というセレン化合物に対する命題を克服するのみならず、予期し得ない神経伝達改善作用をもたらすことを可能とするものである。

本願発明により、神経伝達機能に異常を呈している疾患に対する好適な神経伝達機能異常疾患改善剤、とりわけシナプス伝達改善剤、アセチルコリンレセプター動作改善剤、NOによる神経作用の改善剤が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、セレノプロテインPによるシナプス形成促進作用を示す。分化3日後のLab3抗体染色/透過光同時撮影、Lab3抗体染色されたところは白く光っている。

図2は、ピロカルピンチャレンジ後の生存率の経時変化を示す。

図3は、セレノプロテインP及びセレノプロテインP断片と一酸化窒素との協調による細胞活性化作用を示す。

発明を実施するための最良の形態

ここで用いられるセレノシステイン含有タンパク質に特段の制約はなく、セレノシステインを含み所望の神経伝達改善活性を有するものであれば如何なる分子形態のものをも包含する。すなわち、完全分子型セレノプロテインP（配列番号1）をはじめ種々の分子形態のものが対象となり得る。この中で、好適な態様はセレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群であり、中でもC末端側103個（配列番号2：セレノプロテインP配列260位から362位まで、260KRCINQLLCKLPTDSELAPRSUCCHCRHLIF EKTGSAITUQCKENLPSLCSUQGLRAEENITESCQU RLPPAAUQISQQLIPTASASURUKNQAKKUEUPSN

362) のアミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群は、とりわけ好適な態様として推奨され得る。

5 なお、本願明細書で用いる「当該ペプチド群」とは、セレノシステインを含むペプチドで所望の神経伝達改善活性を有するものであればいかなる配列のペプチドの集合体でもよいが、好適には、セレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、少なくとも1個のセレノシステインを含むペプチドで、当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、
10 糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微細構造の異なるペプチドの集合体を意味する。すなわち、本願発明のセレノプロテインP及びペプチド群は、セレノシステイン含有タンパク質、とりわけセレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、細胞障害抑制活性を有するものであればその分子形態に特段の制約はなく、これらには完全分子型のセレノプロテインPをはじめこれに起因するC末端側ペプチド等が含まれる。このような本願発明のペプチドは、ペプチド合成機を用いて常法に従って調製することもできるし、また、本願発明のペプチドをリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

15 本願発明に使用されるセレノプロテインPまたは当該タンパク質に由来するペプチドもしくはペプチド群を製造する方法は特に限定されるものではないが、例えばヒト血液より分離する方法、または遺伝子組換え技術により製造することができる。本願発明に使用される神経伝達機能異常疾患改善剤の主要構成成分となるセレノプロテインPまたは当該タンパク質に由来するペプチドもしくはペプチド群は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、これを精製同定するに際しては、一つの態様として、血漿を出発原料とし種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、
20 ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、抗体カラムの様な各種アフィニティークロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、
25

硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を組み合わせることにより、所望のセレノプロテインPまたはペプチドもしくはペプチド群を分画することが可能である。その望ましい組み合わせの一例を調製例1及び2に示す。

5 本願発明では、有効成分としての当該タンパク質またはペプチドもしくはペプチド群と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤とすることができる。本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の有効投与量は、投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動する。薬効は投与方法には依存しないが、皮下、皮内、
10 腹腔への投与、血管内への単回（ボラス）投与あるいは点滴投与などが最適である。また、分子量の小さなペプチド群の場合は、経口投与や経皮投与なども可能である。

産業上の利用の可能性

本願発明の神経伝達機能異常疾患改善剤の投与対象は、神経細胞と神経細胞、
15 あるいは神経細胞と筋などの効果器官細胞との情報伝達異常や欠陥に起因し、神経・精神症状や運動失調症状、自律神経失調症状などを呈する疾患であれば特に限定されることはない。例えば、神経伝達機能異常疾患として、シナプス形成異常、アセチルコリンレセプター機能異常、NOによる神経作用異常に起因する疾患が挙げられる。具体的には、アルツハイマー病、不安、自閉症、脳障害、うつ
20 病、ハンチントン病、躁病、疼痛、パーキンソン病、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、発作性運動失調、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート・イートン症候群、先天性パラミオトニア、ラスムッセン脳炎、脊髄小脳変性症、ボツリヌス中毒、蛇毒による中毒などが挙げられる。さらには、緑内障、唾液分泌促進が
25 必要な疾患や、消化管運動賦活が必要な機能性胃腸症などが挙げられる。老化に伴随する痴呆症、運動機能障害などもその対象として考慮され得る。神経伝達機能異常疾患改善剤として本願発明のセレノプロテインPまたはこれに由来するペプチドもしくはペプチド群を主要構成成分として含有する薬剤を使用する場合、本薬剤を単独で投与することもできるし、他の治療薬剤との併用投与も効果を増

大させるための有効な手段として期待できる。また、予防的または治療的投与のいずれにおいても効果が期待できる。

以下、調製例及び実施例に沿って本願発明をさらに詳細に説明するが、これらは本願発明の範囲を何ら限定するものではない。なお、以下に示す調製例及び実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡及びNew England BioLabs社、アマシャムバイオサイエンス社、バイオラド社、シグマ社、ギブコ B R L 社製の試薬を使用した。また、本実施例で使用したセレノプロテインP及びその断片は調製例に示したものを使用した。

調製例 1

(セレノプロテインP断片の精製)

血漿中のヘパリンセファロース結合画分を2M硫酸アンモニウムにより沈殿させ、その沈殿画分に対して5倍以上の20mMT r i s (p H 8.0)により沈殿を溶解させた。この溶液に存在するセレノプロテインPを抗セレノプロテインP抗体カラムに結合させ、P B Sで洗浄した。その後4M尿素を含有する20mMクエン酸バッファー (p H 4.2)によりセレノプロテインPを溶出し、20mMクエン酸バッファー (p H 4.2)で平衡化した陽イオン交換体 (Macroprep High S: BioRad)に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行ない、細胞死抑制活性を示す画分を回収した。この時、全長のセレノプロテインPを得ることが可能であるが、蛋白あたりの細胞死抑制活性は明らかに弱い値を示した。本方法では、短時間の精製が可能であるため、蛋白あたりの細胞死抑制活性の強いセレノプロテインP断片を得ることができた。ここで得られた断片もまた、糖鎖の有無、分子間結合の有無、内部切断の有無などにより種々のサイズの分子種を含む混合画分であり、非還元電気泳動で10-30kDaのサイズを示すセレノプロテインP断片群であった。

調製例 2

(セレノプロテインPの精製)

ヒト血漿に対して、フルオロリン酸ジイソプロピル (和光純薬) 及びポリエチレングリコール3000 (S I G M A) を、それぞれ終濃度2mM、5%になるように添加、1時間攪拌させ、10,000rpmで15分間遠心後、上清を回収した。その

上清をPBSで平衡化した抗セレノプロテインP抗体カラムに結合させ、PBSで洗浄した。その後4M尿素を含有する20mMクエン酸バッファー（pH4～6）によりセレノプロテインPを溶出し、20mMクエン酸バッファーで平衡化した陽イオン交換体（Macroprep High S: BioRad）に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行ない、セレン含量の最も多い画分を回収した。この方法により還元電気泳動で64kDaの完全長セレノプロテインPを血漿1リットルから2mg程度得ることができた。

実施例1

（シナプス形成促進作用）

セレノプロテインPのシナプス形成における効果を確認するために、神経様細胞であり、シナプス形成や受容体の研究で広く使用されているNG108-15細胞（マウス神経芽腫とラット・グリオーマの雑種細胞：ATCC NO. HB-12317）を用いて神経細胞への分化実験を行なった。ポルオルニチン・コーティングを施した35mmディッシュに、10%胎児牛血清、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を補ったDMEMを用いてNG108-15細胞をまき、37℃10%CO₂にて培養した。1～2日後、HT（ヒポキサンチン、チミジン）を補った1%胎児牛血清DMEM（無血清培地）に培地交換し、0.1mMジブチルサイクリックAMP（dbcAMP）を加え、分化させた。この際、セレノプロテインPを4.36μg/mL培地に加え、3日間培養した。培養後、細胞がシートしたディッシュをリン酸バッファー生理食塩水（以下PBS）にて2回リンスし培養液を洗浄した。続いてPBSで4%濃度に調製したパラホルムアルデヒド液で細胞タンパクの固定化処理を行なった。室温にて30分間の固定化処理後、PBSにて2回リンスし固定液を除いた。続いて神経細胞のシナプスに特異的に発現しているタンパク質であるRab3aに反応する抗Rab3aマウスモノクローナル抗体（Synaptic Systems 社）をPBSにて濃度調製し、非特異タンパクのブロッキング処理のため10%ウシ血清アルブミン溶液を加えて、室温にて1時間反応させた（1次抗体反応）。抗体反応終了後、PBSにて3～4回リンスした後、蛍光プローブAlexa 594を架橋した抗マウスIgG抗体を室温にて1時間反応させた（2次抗体反応）。抗体反応終了後、PBSにて3～4回リンスした後、レーザ

一顕微鏡にて励起波長 594 nm にて赤色蛍光像を観察・デジタルカメラ撮影した。明視野撮影像と蛍光顕微鏡撮影像を同視野で撮影し、2枚の写真を合成して解析に用いた。

これらの培養の結果、セレノプロテインを加えて3日間分化誘導した細胞では、明らかに突起伸展が複雑であり、粒状のvaricosityが多かった。細胞体にも短い突起が多く見られた。一方、セレノプロテイン非存在下の細胞は概して丸く、長い突起を有する細胞もあるが、varicosityは少なかった。シナプス特異的な抗 Rab3a マウスモノクローナル抗体で染色した結果、図1に示すように、明らかにセレノプロテインP添加群では神経突起上にRab3a染色された瘤状の粒が多く認められた。このRab3a抗体特異的に染色されたシナプスがどのくらいの割合で存在するかをマッキントッシュ用画像解析ソフトウェア「Mac SCOPE (三谷商事製)」を用いて免疫陽性のスポットを計測した。SeP添加群で4視野、SeP非添加群で3視野の撮影画像を任意に選び解析に使用した。撮影画像の神経細胞体部分を選択範囲から除外し、神経突起の部分のみを解析範囲とした。デジタル画像上では免疫陽性部分は三原色(RGB)レベルで赤(R)の値を高くもっているため解析ソフトウェアで赤の値をもっているスポットのみを抽出し、そのスポットの計測が可能である。同時に、免疫反応性が無いvaricosity個数を手動で計測し、最後に画像上の総varicosity数に占める免疫陽性のvaricosity数を割合(%)として計算した。その結果、表1に示すように、明らかにシナプス形成が促進されていることが示された。

表1

	Rab3a 免疫陽性率±SD (%)
SeP 添加群	66.0 ± 2.75
SeP 非添加群	38.8 ± 13.3

実施例2

(アセチルコリンレセプター機能亢進作用)

セレノプロテインPのコリン作動性神経細胞への効果を確認するために、神経細胞及び神経細胞と筋肉の接合部(シナプス終末)に存在するアセチルコリンレセプターに作動的に作用する薬剤であるピロカルピンをマウスに投与し、けいれ

んを誘発させる実験を行なった。ピロカルピンは副交感刺激作用をもち、マウスに投与すると四肢の間代性けいれんから全身けいれんに至る。

9週齢の雄のICRマウス（体重30～43g、日本クレアより購入）12匹を2群（6匹／群）に分け供試した。ピロカルピン投与1時間前に生理食塩水で2.5mg/mLに濃度調製したセレノプロテインPを1匹あたり0.5mg相当量（液量200μL）投与し試験群とした。対照群には等量の生理食塩水を腹腔内投与した。ピロカルピン（ピロカルピン塩酸塩、和光純薬）を生理食塩水にて100mg/mLに調製後、270～320mg/kg相当量を腹腔内注射により投与し、投与直後よりデジタルビデオによる撮影を開始し、実験の記録を行なった。ピロカルピン投与後60分間の観察時間を設け、全身けいれん発作を発現するまでの時間及び生死を評価の基準とした。セレノプロテインPがピロカルピンの作用を増強すれば、発作までの時間が短く、てんかん症状亢進により死亡率も上昇することになる。

この実験の結果、表2に示すように、セレノプロテインP投与群では対照群に比べ全身けいれん発作を発現するまでの時間が有意に短く、セレノプロテインPをマウスに投与したことによるけいれん誘導作用の増長が確認された。

表2

	ピロカルピン投与後のけいれん発作までの時間±SD
SeP投与群	6分47秒 ± 40秒*
SeP非投与群	12分29秒 ± 300秒*

*p < 0.05

同様に図2に示すように、両群の生存率についてもセレノプロテインP投与群では対照群に比べて生存率が明らかに低下している結果を確認した。この実験の結果、セレノプロテインPがピロカルピンによるムスカリン性アセチルコリンレセプターへの作用を増強させている可能性が示唆された。

実施例3

（NOによる細胞活性化増強作用）

シナプス伝達物質としてのNOの神経作用にセレノプロテインPが及ぼす効果を確認するために、培養した初代神経細胞にセレノプロテインPの存在下におい

て、NO発生剤であるS-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP、同仁化学研究所製) を作用させ、セレノプロテインPの存在下において神経細胞のミトコンドリア呼吸能に変化が現れるか実験した。ミトコンドリア呼吸能の測定にはミトコンドリア内膜の脱水素酵素活性を簡易に測定するキット

5 (Cell Counting kit-8、同仁化学研究所製) を用いた。

C57BL/6妊娠14日齢マウス (日本チャールズリバーより購入) から胎仔を摘出し、胎仔由来の脳皮質を0.25%トリプシンEDATにて分散処理後、B27サプリメントを添加したNeurobasal Medium (いずれもギブコBRL製) にて37℃、5%CO₂インキュベーター内で培養し初代神経細胞の培養を行なった。培養に
10 は予めポリ-D-リジンを4 μg/cm²にてコーティングした48穴マルチウェルカルチャープレートを用い、2×10⁵ cells/wellの密度で細胞を播き込んだ。培養液量は500 μL/wellにて培養し、2~3日に一度の頻度で半量を新鮮な培養液に交換し、11日間細胞を維持した。培養11日目に培養液を除き、Neurobasal Mediumのみの培養液に交換した。その際、SNAPを
15 添加しない群とSNAPを50 μMの濃度で添加した群を設定し、それぞれの群に対し、セレノプロテインPと亜セレン酸ナトリウムをセレン濃度で1 μMになるように、またセレノプロテインP断片をセレン濃度で0.26 μMで添加した群を設定した。SNAP濃度の50 μMは神経細胞にダメージを与えない濃度として設定した。37℃、5%CO₂インキュベーター内で15時間培養後、Cell
20 Counting kit-8の反応液を培養液の1/10量添加し、37℃、5%CO₂インキュベーター内で4時間反応させた。呈色反応後、96穴のマイクロプレートへ培養上清を100 μLずつ移し、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの波長を参照波長650 nmにて測定した。

この実験の結果、図3に示すように、セレノプロテインPを添加するだけで初
25 代神経細胞のミトコンドリア内膜の脱水素酵素 (ミトコンドリア呼吸能) の活性が上昇傾向にあった。同じく、セレノプロテインP断片のみを添加した群では有意に初代神経細胞の細胞活性を上昇させた。NO発生剤であるSNAPの存在下では、セレノプロテインP及びセレノプロテインP断片いずれの添加によっても神経細胞のミトコンドリア呼吸能を有意に上昇させた。ところが、この作用は亜

5

セレン酸ナトリウム添加群には確認されず、セレノプロテインPもしくはセレノプロテインP断片による特異的な作用と考えられる。初代神経細胞は増殖しない（細胞分裂しない）と考えられているので、この酵素活性の上昇は細胞数の増加によるものではなく、細胞内が活性化したためだと考えられる。このようにセレノプロテインP及びセレノプロテインP断片には、NOと協調して細胞内のミトコンドリア呼吸能、すなわち細胞活性を増強する作用があり、このような作用を通じて、生体内のシナプス伝達・神経回路網全体の活性化をもたらすものと考えられる。

請求の範囲

1. セレノシステイン含有タンパク質及び／または当該タンパク質を構成するセレノシステイン含有ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群を主たる成分とする神経伝達機能異常疾患改善剤。

5 2. 前記セレノシステイン含有タンパク質がセレノプロテインPである請求項1記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

3. 前記セレノシステイン含有ペプチドがセレノプロテインPのC末端側ペプチドである請求項1記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

10 4. 前記セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群がセレノプロテインPのC末端側260位アミノ酸から362位アミノ酸までのアミノ酸配列に由来し、それらのアミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはペプチドまたは当該ペプチド群である請求項1から
15 請求項3のいずれかに記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

5. 前記セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチドより構成されるペプチド群が、次式、

20 (I) : Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys
Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Sec Cys Cys His Cys Arg His Leu (配
列番号4) 及び／または

25 (II) : Thr Gly Ser Ala Ile Thr Sec Gln Cys
Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Sec Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号
5)

(式中Alaはアラニン、Argはアルギニン、Asnはアスパラギン、Aspはアスパラギン酸、Cysはシステイン、Glnはグルタミン、Gluはグルタミン酸、Glyはグリシン、Hisはヒスチジン、Ileはイソロイシン、Lysはリジン、Leuはロイシン、Metはメチオニン、Pheはフェニルアラニ

ン、P r oはプロリン、S e rはセリン、T h rはトレオニン、T r pはトリプトファン、T y rはチロシン、V a lはバリン及びS e cはセレノシステインの各残基をそれぞれ表す) で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有し、うち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である請求項4記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

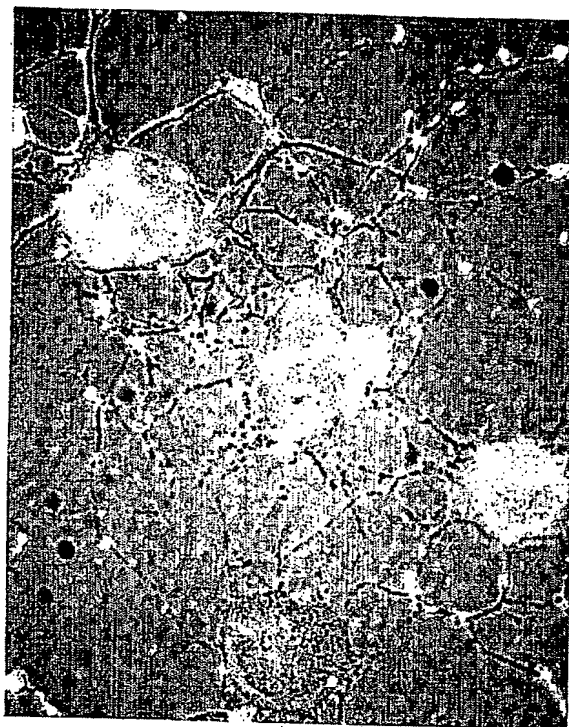
6. 神経伝達機能異常疾患が、シナプス形成異常、アセチルコリンレセプター機能異常または一酸化窒素 (NOと称することがある) による神経作用異常に起因する疾患である、請求項1から請求項5のいずれかに記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

7. 神経伝達機能異常疾患が、重症筋無力症、スローチャネル症候群、先天性筋無力症、ランバート・イートン症候群、アルツハイマー病、痴呆症、脊髄小脳変性症、自律神経失調症、陰茎海綿体の勃起不全、脳血流不全、機能性胃腸症、及び緑内障より選択される請求項6記載の神経伝達機能異常疾患改善剤。

1/3

图 1

SeP(4.36 μ g/mL)存在下



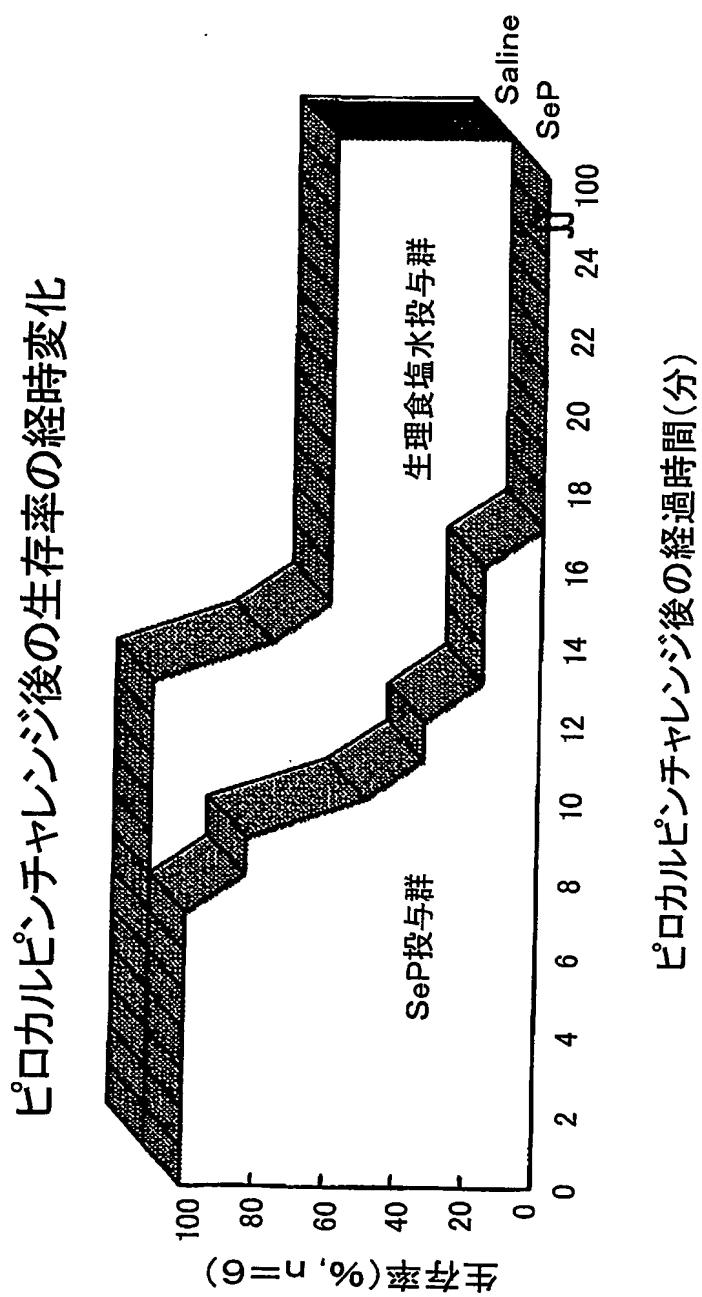
SeP非存在下



BEST AVAILABLE COPY

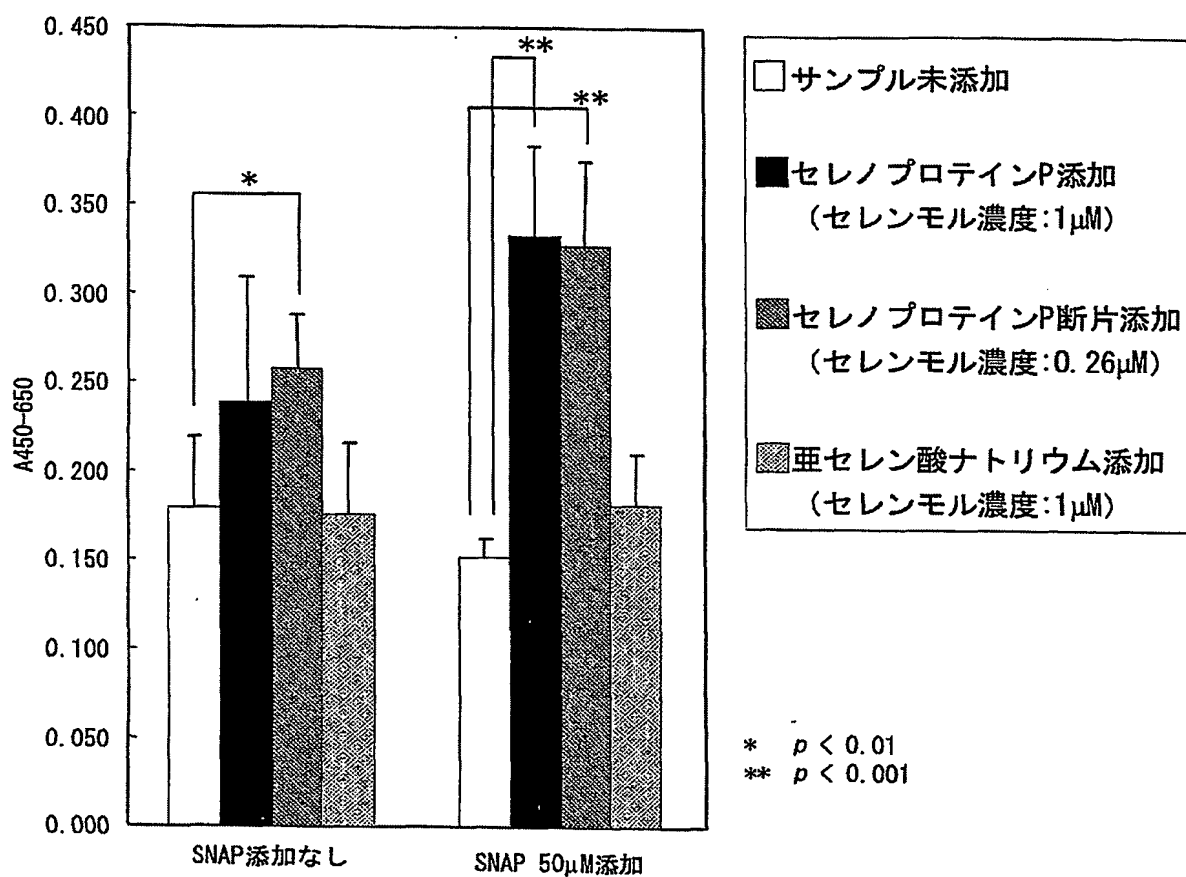
2/3

図 2



3/3

図 3



1/5

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel Remedies for Diseases of abnormal neurotransmission

<130> 664194

5 <150> JP 2002-348714

<151> 2002-11-29

<160> 5

<210> 1

10 <211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

15 <400> 1

Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro Pro Ala Trp

1 5 10 15

Ser Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly Ser Val

16 20 25 30

20 Thr Val Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser Xaa Tyr Leu Cys Ile Ile

31 35 40 45

Glu Ala Ser Lys Leu Glu Asp Leu Arg Val Lys Leu Lys Lys Glu

46 50 55 60

Gly Tyr Ser Asn Ile Ser Tyr Ile Val Val Asn His Gln Gly Ile

25 61 65 70 75

Ser Ser Arg Leu Lys Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Ser Glu

76 80 85 90

His Ile Pro Val Tyr Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp

91 95 100 105

2/5

	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Lys	Asp	Asp	Phe	Leu	Ile	Tyr	Asp	Arg
	106				110					115					120
	Cys	Gly	Arg	Leu	Val	Tyr	His	Leu	Gly	Leu	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu
	121				125					130					135
5	Thr	Phe	Pro	Tyr	Val	Glu	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Ala	Tyr	Cys	Glu
	136				140					145					150
	Lys	Lys	Cys	Gly	Asn	Cys	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Lys	Asp	Glu	Asp
	151				155					160					165
	Phe	Cys	Lys	Arg	Val	Ser	Leu	Ala	Thr	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu
10	166				170					175					180
	Thr	Pro	Ser	Pro	His	Tyr	His	His	Glu	His	His	His	Asn	His	Gly
	181				185					190					195
	His	Gln	His	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ser	Glu	Asn	Gln	Gln	Pro
	196				200					205					210
15	Gly	Ala	Pro	Asn	Ala	Pro	Thr	His	Pro	Ala	Pro	Pro	Gly	Leu	His
	211				215					220					225
	His	His	His	Lys	His	Lys	Gly	Gln	His	Arg	Gln	Gly	His	Pro	Glu
	226				230					235					240
	Asn	Arg	Asp	Met	Pro	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys
20	241				245					250					255
	Lys	Leu	Cys	Arg	Lys	Arg	Cys	Ile	Asn	Gln	Leu	Leu	Cys	Lys	Leu
	256				260					265					270
	Pro	Thr	Asp	Ser	Glu	Leu	Ala	Pro	Arg	Ser	Xaa	Cys	Cys	His	Cys
	271				275					280					285
25	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Glu	Lys	Thr	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Xaa	Gln
	286				290					295					300
	Cys	Lys	Glu	Asn	Leu	Pro	Ser	Leu	Cys	Ser	Xaa	Gln	Gly	Leu	Arg
	301				305					310					315
	Ala	Glu	Glu	Asn	Ile	Thr	Glu	Ser	Cys	Gln	Xaa	Arg	Leu	Pro	Pro

3/5

316 320 325 330
 Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser
 331 335 340 345
 Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro
 5 346 350 355 360
 Ser Asn
 361

<210> 2

10 <211> 103

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

15 <400> 2

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile
 16 20 25 30
 20 Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn
 31 35 40 45
 Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn
 46 50 55 60
 Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln
 25 61 65 70 75
 Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg
 76 80 85 90
 Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn
 91 95 100

4/5

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 3

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

10 1 5 10 15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile

16 20 25 30

Phe Glu Lys

31

15

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 4

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

1 5 10 15

25 Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu

16 20 25

<210> 5

<211> 28

5/5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

5

<400> 5

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser

1

5

10

15

Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

16

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/15227

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, A61P1/00, 3/12, 9/00, 15/10, 21/04, 25/00,
25/02, 25/14, 25/16, 25/18, 25/22, 25/24, 25/28, 27/06,
39/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/42, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN),
JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS), CAPLUS (STN), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/31131 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 02 June, 2000 (02.06.00), Full text & AU 200011795 A & EP 1132402 A1	1-7
X	WO 02/076492 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text (Family: none)	1-7
X	WO 02/092121 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 21 November, 2002 (21.11.02), Full text (Family: none)	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07 January, 2004 (07.01.04)

Date of mailing of the international search report
27 January, 2004 (27.01.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/15227

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	YAN, J., BARRETT, J.N., Purification from Bovine Serum of a Survival-Promoting Factor for Cultured Central Neurons and Its Identification as Seleno protein-P., J.Neurosci., 1998, 18(21), pages 8682 to 8691, particularly, abstract	1-5 6,7
X A	MOSTERT, V., Selenoprotein. P: Properties Functions, and Regulation. Arch. Biochem. Biophys., 2000, 376(2), pages 433 to 438, particularly, abstract	1-5 6,7
X A	SAITO, Y., TAKAHASHI, K., Selenoprotein P: Its Structure and Functions. J. Health Sci., 2000, 46(6), pages 409 to 413, particularly, abstract	1-5 6,7
X A	YANG, X., et al., Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1474, pages 390 to 396, particularly, abstract	1-5 6,7
X A	KIM, J.-R., et al., Oxidation of Proteinaceous Cysteine Residues by Dopamine-Derived H2O2 in PC12 Cells. Arch. Biochem. Biophys., 2002, 397(2), pages 414 to 423; full text	1-5 6,7
P,X	WO 03/029469 A1 (Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 10 April, 2003 (10.04.03), Full text (Family: none)	1-7
A	ALSINA, B. et al., Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of Drosophila melanogaster. J. Cell. Sci., 1999, 112, pages 2875 to 2884	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17,

A61P1/00, 3/12, 9/00, 15/10, 21/04, 25/00, 25/02, 25/14, 25/16, 25/18, 25/22, 25/24, 25/28, 27/06, 39/02, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-38/42, A61P1/00-43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS), Cplus (STN), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/31131 A1 (財団法人 化学及血清療法研究所) 2000.06.02, 全文参照, & AU 200011795 A & EP 1132402 A1	1-7
X	WO 02/076492 A1 (財団法人 化学及血清療法研究所) 2002.10.03, 全文参照 (ファミリーなし)	1-7
X	WO 02/092121 A1 (財団法人 化学及血清療法研究所) 2002.11.21, 全文参照 (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.01.2004

国際調査報告の発送日

27.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4 C

9736

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	YAN, J., BARRETT, J.N.. Purification from Bovine Serum of a Survival-Promoting Factor for Cultured Central Neurons and Its Identification as Selenoprotein-P. J. Neurosci., 1998, 18(21), pp.8682-8691, 特に要約	1-5
A		6, 7
X	MOSTERT, V.. Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation. Arch. Biochem. Biophys., 2000, 376(2), pp.433-438, 特に要約	1-5
A		6, 7
X	SAITO, Y., TAKAHASHI, K..Selenoprotein P: Its Structure and Functions. J. Health Sci., 2000, 46(6), pp.409-413, 特に要約	1-5
A		6, 7
X	YANG, X., <i>et al.</i> Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 2000, 1474, pp.390-396, 特に要約	1-5
A		6, 7
X	KIM, J.-R., <i>et al.</i> Oxidation of Proteinaceous Cysteine Residues by Dopamine-Derived H2O2 in PC12 Cells. Arch. Biochem. Biophys., 2002, 397(2), pp.414-423, 全文参照	1-5
A		6, 7
P X	WO 03/029469 A1(財団法人 化学及血清療法研究所) 2003.04.10, 全文参照 (ファミリーなし)	1-7
A	ALSINA, B., <i>et al.</i> Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of <i>Drosophila melanogaster</i> . J. Cell Sci., 1999, 112, pp.2875-2884	1-7